

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(21) 출원번호	10-2000-7008769	(65) 공개번호	10-2001-0040867
(22) 출원일자	2000년08월10일	(43) 공개일자	2001년05월15일
번역문 제출일자	2000년08월10일		
(86) 국제출원번호	PCT/US1999/002923	(87) 국제공개번호	WO 1999/40938
국제출원일자	1999년02월10일	국제공개일자	1999년08월19일

AP ARIPO특허 : 가나, 감비아, 캐냐, 레소토, 말라위, 수단, 스와질랜드, 우간다, 짐바브웨,

EA 유라시아특허 : 아르메니아, 아제르바이잔, 벨라루스, 키르키즈스탄, 카자흐스탄, 몰도바, 러시아, 타지키스탄, 투르크맨,

EP 유럽특허 : 오스트리아, 벨기에, 스위스, 독일, 덴마크, 스페인, 프랑스, 영국, 그리스, 아일랜드, 이탈리아, 룩셈부르크, 모나코, 네덜란드, 포르투칼, 스웨덴, 핀란드, 사이프러스,

OA OAPI특허 : 부르키나파소, 베닌, 중앙아프리카, 콩고, 코트디브와르, 카메룬, 가봉, 기니, 말리, 모리타니, 니제르, 세네갈, 차드, 토고, 기니 비사우.

(30) 웃선권주장 60/074.503 1998년02월12일 미국(US)

(73) 특허권자 와이어쓰 홀딩스 코포레이션
미합중국 뉴저지 07940 매디슨 파이브 지랄다-팜즈

(72) 빌명자 미쉬킨에릭эм.
미국뉴욕10950면로라로에로드893

엘드릿지존에이치.
미국뉴욕14450페어포트비어트리스코우브4

(74) 대리인 차유근

심사관 : 김경미

(54) 인터루킨-12 및 허피스 심플렉스 바이러스 항원을포함하는 백신

요약

본 발명은 허피스 심플렉스 바이러스 항원 같은 항원, 및 인터루킨 IL-12의 혼합물을 포함하고, 혼탁 미네럴에 흡착될 수 있는 백신 조성물에 관한 것이다. 이러한 백신 조성물은 항원에 대한 보호 면역반응을 조절한다.

색인어

허피스 심플렉스 바이러스 항원, 인터루킨-12, 미네럴

명세서

배경기술

면역 시스템은 병원체 공격에 다수의 메커니즘을 사용한다; 그러나, 이들 메커니즘 모두가 면역 후에 늘 활성화되는 것은 아니다. 백신접종에 의해 유도된 보호면역은 병원체에 저항하거나 이를 제거하기 위한 백신의 적정 면역반응 도출능에 좌우된다. 병원체에 따라, 세포 매개성 및/또는 체액성 면역반응을 요구할 수도 있다.

면역반응에서 헬퍼 T 세포의 역할에 대한 현재의 패러다임은 T 세포가 이들이 생성하는 사이토킨을 기초로 하여 서브세트로 분리될 수 있고, 이들 세포에서 관찰된 독특한 사이토킨 프로필이 이들의 기능을 결정한다는 것이다. 이러한 T 세포 모델은 두 가지 주요 서브세트를 포함한다: 세포성 및 체액성 면역반응 모두를 증대시키는 IL-2 및 인터페론 γ (IFN- γ)를 생성하는 TH-1 세포, 및 체액성 면역반응을 증대시키는 IL-4, IL-5 및 IL-10을 생성하는 TH-2 세포(Mosmann et al., J. Immunol. 126:2348(1986)). 면역되는 유기체에서 더 강한 면역반응을 얻고 항원-보유체에 대한 숙주 저항성을 강화하기 위하여 때로는 항원의 면역원능을 증강시키는 것이 바람직하다. 투여되는 항원의 면역원성을 증강시키는 물질은 보조제로 알려져 있다. 예를 들면, 특정의 림포카인은 보조 활성을 지닌 것으로 나타났으며, 따라서 항원에 대한 면역반응을 증강시킨다(Nencioni et al., J. Immunol. 139:800-804(1987); EP285441 to Howard et al.).

발명의 개요

본 발명은 허피스 심플렉스 바이러스 당단백질 D, 인터루킨 IL-12 및 혼탁 미네럴의 혼합물을 포함하는 백신 조성물에 관한 것이다. IL-12는 미네렐 혼탁에 흡착되거나 간단히 이와 혼합될 수 있다. 본 발명의 특정 양태에서, IL-12는 알룸(예를 들면, 수산화 알루미늄 또는 인산 알루미늄) 같은 미네렐 혼탁에 흡착된다. 특정 양태에서, IL-12는 인간 IL-12이다. 본 발명은 또한 생리학적으로 허용되는 비히클을 추가로 포함하는 백신 조성물에 관한 것이다. 본 발명은 또한, 허피스 심플렉스 바이러스 당단백질 D, 보조량의 인터루킨-12, 혼탁 미네렐의 혼합물을 포함하고, 임의로 생리학적으로 허용되는 비히클을 포함하는 면역원 조성물에 관한 것이다.

본 발명의 조성물은 항원에 대한 보호 면역반응을 조절한다; 즉, 백신 조성물은 백신접종 숙주의 항체반응을 정량적, 정성적으로 향상시킬 수 있고, 병원체에 대한 보호반응을 위한 세포 매개성 면역을 정량적으로 증가시킬 수 있다. 본 발명의 특정 양태에서, 항원은 허피스 심플렉스 바이러스 I 형 및/또는 II 형의 엔빌로프 당단백질 D(gD)와 같은 허피스 심플렉스 바이러스(HSV) 항원이다.

본 발명은 또한, HSV gD와 IL-12를 혼탁 미네렐과 혼합하는 단계를 포함하는 백신 조성물의 제조방법에 관한 것이다. 특히, IL-12는 미네렐 혼탁에 흡착된다. 본 발명은 또한, 생리학적으로 허용되는 용액 중의 HSV gD, IL-12 및 혼탁 미네렐의 혼합물을 포함하는 백신 조성물 유효량을 측정하는 단계를 포함하는, 보호 면역반응을 위한, 백신접종자의 체액성 및/또는 세포-매개성 면역 도출 또는 증가방법에 관한 것이다. 특히, IL-12는 미네렐 혼탁에 흡착된다.

발명의 상세한 설명

당단백질 D(gD)는 허파스 심플렉스 바이러스(HSV) I 및 II 형의 엔빌로프 당단백질이다. HSV gD는 동물 모델에서 1차 및 화귀성 HSV 감염에 대한 강력한 보호면역 유도제인 것으로 나타났다(Mishkin et al., Vaccine 9:147-153 (1991); Landolfi et al., Vaccine 11:407-414 (1993)).

IL-12는 다양한 항원-제공 세포, 주로 대식구 및 단핵구에 의해 생성된다. 이는 순수한(naive) T 세포로부터 TH-1 세포의 유도에서 중요한 요소이다. IL-12의 생성 및 이에 대한 반응능은 예를 들면, 기생충 감염, 특히 레이슈마니아증 동안, 보호성 TH-1-유사 반응의 발생에 중요한 것으로 나타났다(Scott et al., U.S. 특허 No. 5,571,515). IL-12의 효과는 NK 세포 및 T 헬퍼 세포에 의해 생성된 IFN- γ 에 의해 매개된다. IFN- γ 는 T-의존성 단백질 항원에 대한 IgG2a 항체의 유도(Finkelman and Holmes, Annu. Rev. Immunol. 8:303-33(1990)) 및 T-독립성 항원에 대한 IgG3 반응(Snapper et al., J. Exp. Med. 175:1367-1371(1992))에 중요하다. 본래는 천연 살해 세포 자극인자로 불렸던 인터루킨-12(IL-12)는 해태로 이량체 사이토킨이다(Kobayashi et al., J. Exp. Med. 170:827 (1989)). 재조합 숙주세포내 IL-12 단백질의 발현 및 분리는 1990년 5월 17일자로 공개된 국제특허출원 WO 90/05147에 설명되어 있다.

본원에 기술된 연구는 허파스 심플렉스 바이러스(HSV) 백신에 보조제로서 IL-12의 사용에 관한 것이다. 따라서, 본 발명은 HSV gD, IL-12 및 혼탁 미네럴의 혼합물을 포함하는 백신 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 특정 양태에서, IL-12는 알룸(예를 들면, 수산화 알루미늄 또는 인산 알루미늄) 같은 미네럴 혼탁에 흡착된다. 이를 백신 조성물은 HSV에 대한 보호 면역반응을 조절한다; 즉, 백신 조성물은 병원성 항원에 대한 보호반응을 위해 백신접종 숙주의 세포 매개성 면역을 도출할 수 있다.

IL-12는 몇몇 적당한 공급원으로부터 수득될 수 있다. IL-12는 재조합 DNA법에 의해 생성될 수 있다; 예를 들면, 인간 IL-12를 암호화하는 유전자를 클로닝하여 숙주 시스템에서 발현시키면, 다량의 순수한 인간 IL-12가 생성된다. 또한, IL-12의 생물학적 활성 서브유닛 또는 단편도 본 발명에 유용하다. 아울러, 특정의 T 림프구 계통도 고수준의 IL-12를 생성하여, 용이하게 이용할 수 있는 공급원을 제공한다. 재조합 인간 및 쥐 IL-12의 시판원은 Genetics Institute, Inc.(미국 매사추세츠 케임브리지 소재)를 포함한다.

본 발명의 항원, 예를 들면 HSV 항원은 포유동물 숙주와 같은 척추동물에서 항원에 대한 면역반응 도출에 사용될 수 있다. 예를 들면, 항원은 HSV gD 단백질 항원 또는 면역반응 자극능을 보유하는 이의 일부일 수 있다.

본 발명의 방법은 포유동물, 특히 인간 또는 기타 영장류에 항원, 예를 들면, HSV gD 항원, 보조량의 IL-12 및 혼탁 미네럴의 혼합물을 포함하는 면역학적 유효량의 백신 조성물을 투여하는 단계를 포함한다. 특히, IL-12는 미네럴 혼탁에 흡착된다. 본원에서 사용되는 IL-12의 "보조량"이란 약 1 나노그램 내지 약 20 마이크로그램, 좀더 구체적으로는 약 100 나노그램 내지 약 5 마이크로그램 용량을 의미한다. 본원에서 사용되는 백신 조성물의 "면역학적 유효" 용량은 면역반응 도출에 적당한 용량이다. 특정 용량은 치료하고자 하는 포유동물의 연령, 체중 및 의학적 증상과, 투여방법에 좌우된다. 적정 용량은 당업자에 의해 용이하게 결정될 것이다. 백신 조성물은 생리 식염수 또는 포스페이트 완충 식염수 또는 글리세롤이나 프로필렌 글리콜 같은 에탄올 폴리올 같이 약학적으로 또는 생리학적으로 허용되는 비히클로 임의로 투여될 수 있다. 소량의 세제도 백신 안정성 증강을 위해 포함시킬 수 있다.

백신 조성물은 식물성 오일 또는 이의 에멀션, 계면활성제, 예를 들면 헥사데실아민, 옥타데실 아미노산 에스테르, 옥타데실아민, 라이소레시틴, 디메틸-디옥타데실암모늄 브로마이드, N,N-디옥타데실-N'-N'비스(2-하이드록시에틸-프로판 디아민), 메톡시헥사데실글리세롤, 및 플루로닉 폴리올; 폴리아민, 예를 들면, 피란, 덱스트란설페이트, 폴리 IC, 카보폴; 웨타이드, 예를 들면, 뮤라밀 디펩타이드, 디메틸글라이신, 터프트신; 면역 자극 복합체; 오일 에멀션; 리포폴리사카라이드, 예를 들면 MPL^R(3-O-탈아실화 모노포스포릴 리피드 A; RIBI ImmunoChem Research, Inc., Hamilton, Montana); 및 미네럴 젤 같은 부가적인 보조제를 임의로 포함할 수 있다. 본 발명의 항원은 또한 리포솜, 와우상(cochleates), 생분해성 중합체, 예를 들면 폴리-락타이드, 폴리-글리콜라이드 및 폴리-락타이드-코-글리콜라이드, 또는 ISCOMS(면역자극 복합체) 중으로 훈입될 수 있고, 보충성 활성성분이 또한 사용될 수 있다. 본 발명의 항원은 또한 세균 독소 및 이의 약독화 유도체와 함께 투여될 수 있다. 본 발명의 항원은 또한, 인터루킨-2, IFN- γ 및 GM-CSF(이에 국한되지 않음)를 포함하여 기타 림포킨과 함께 투여될 수 있다.

백신은 비경구, 동맥내, 피내, 경피(서방형 중합체의 사용 등에 의해), 근육내, 복강내, 정맥내, 피하, 경구 및 비내 투여경로(이에 국한되지 않음)를 포함하여 다양한 경로에 의해 인간이나 동물에 투여될 수 있다. 이러한 백신에 사용되는 항원의

양은 항원의 동질성에 따라 변동될 것이다. 본 백신에 적용하기 위한 통상의 캐리어 항원과 함께 사용되는 설정 용량 범위의 조정과 조작은 당업자의 역량 안에 있다. 본 발명의 백신은 미숙 및 성체 온혈동물 모두와, 특히 인간의 치료에 사용하기 위한 것이다. 전형적으로, 항원 및 IL-12/알룸 배합물을 동시에 투여될 것이다.

IL-12의 보조작용은 다수의 중요한 합축성을 지닌다. IL-12의 보조성은 백신접종 유기체에서 항원에 대해 생성된 보호 항체의 농도를 증가시킬 수 있다. 결과적으로, 유효(즉, 보호) 백신접종은 통상적으로 요구되는 것보다 소량의 항원으로 성취될 수 있다. 항원 필요량의 이러한 감소는 제조하기가 곤란하고 비용이 많이 드는 백신의 좀더 광범위한 사용을 선도할 수 있다. 또한, 보조제로서 IL-12의 사용은 면역반응을 도출하기에 항원성이 약하거나 면역원성이 불충분한 항원의 능력을 증강시킬 수 있다. 이는 또한 항원이 유효 면역에 통상적으로 요구되는 농도에서 유독할 때 좀더 안전한 백신접종을 제공할 수도 있다. 항원의 양을 감소시킴으로써, 유독 반응의 위험이 감소된다.

전형적으로, 백신접종 양생법은 "보호" 면역반응을 자극하기 위하여 수주일 또는 수개월에 걸친 항원 투여를 필요로 한다. 보호 면역반응은 백신이 지향하는 특정 병원체에 의해 야기된 질병으로부터 면역된 유기체를 보호하기에 충분한 면역반응이다. IL-12는 HSV 항원과 같은 항원과 투여되고, 혼탁 미네럴(예를 들면, 알룸)과 혼합되거나 이에 흡착될 때, 보호 면역반응의 생성을 가속시킬 수 있다. 이는 유효 백신접종 양생법의 타임코스를 감소시킬 수 있다. 일부 경우에는 단일 용량으로 보호 반응의 생성을 유도할 수도 있다. 본 발명의 백신 조성물은 또한 HSV에 이미 감염된 대상에서 증후 에피소드의 수와 중증도를 감소시키는 데 치료적으로 유용하다.

본원에 기술된 작업의 결과로, 혼탁 알룸에 흡착된 IL-12와 HSV 서브유닛 백신의 동시투여는 반응의 압도적인 TH-1-연관 프로필을 도출하는 것으로 나타났으며; 이러한 점은 gD 서브유닛 백신에 대한 면역 유도의 새로운 패턴이다. 본원에서 좀더 상세히 기술되는 바와 같이, 가용성이고 인산 알루미늄 흡착된 gD에 의한 면역의 예비임상 모델에서 작동적인 IL-12의 용량범위가 결정되었다. 본원에 기술된 결과에 의하면 또한, 알룸과 함께 또는 알룸 없이 사이토킨/당단백질에 의한 면역은 TH-1-연관 항체 프로필을 도출하는 것으로 드러났다. 백신과 IL-12/알룸의 동시투여는 ELISA 및 바이러스 중화에 의해 측정된 안티-gD 항체의 수준 증가에 의해 나타나는 바와 같이 서브유닛 백신에 대한 면역반응성에 보조효과가 있다.

바이러스 감염력과 체액성 및 세포성 면역반응의 주요 표적에 필수인 것으로 나타난 헤피스 심플렉스 바이러스 I 형 및 II 형의 엔빌로프 당단백질인 당단백질 D(gD)는 인간에서 1차 및 회귀성 헤피스 감염에 대해 사용하기 위한 1차 백신 후보 역할을 한다. 현재 인간 사용에 허용된 알루미늄계 또는 다른 면역흡착제로 제형된 gD 서브유닛 백신의 투여는 몇몇 예비 임상 연구에서 TH-2 T 헬퍼 림프구의 현저한 자극이 원인이 될 수 있는 면역반응 프로필을 유도하는 것으로 나타났다. 그러나, 회귀성 헤피스 질환의 저지 및 적당한 보호 면역기능의 확립은 반응의 강력한 TH-1 프로필의 유도를 요할 것으로 보인다.

본원에 기술된 작업의 결과는 가용성이고 AlPO₄-흡착된 gD의 동시투여로 체액성 및 세포성 면역반응의 정량적 증가, 및 체액성 반응의 정성적 변화가 일으남을 나타낸다. 이러한 점은 IL-12의 존재하에 백신에 의해 도출된 변형된 IgG 서브클래스 프로필에 의해 입증된다. 사실, IgG2a 항체의 우선적인 유도는 이의 효율적인 보체 고정능과 함께 TH-1 반응 프로필의 특징 중 하나이다. IL-12 투여에 의한 면역반응의 면역조절은 또한 IL-4(TH-2 연관)와 비교시, IFN-γ(TH-1 연관)의 쉬프팅 비율과 크기에서 자명하다.

또한, 가용성 서브유닛 백신을 IL-12와 동시투여하여 면역시킨 마우스에서 항원-특이성 세포분해 활성의 유도에 주목하는 것이 특히 중요하다. 반응의 이러한 패턴은 IL-12의 첨가가 gD 서브유닛 백신에 대한 면역반응의 특성에 있어 근본적인 변화를 초래하는 데, 그 이유가 gD 서브유닛 백신이 선행 연구에서 세포분해 활성 유도능을 거의(있다 치더라도) 입증하지 못하였음을 시사한다.

이러한 신규 제형에 의해 도출된 면역반응의 스펙트럼은 자연적인 바이러스 감염에 의해 유도된 것과 밀접하게 관련이 있고 병이 없는 혈청 양성인에서 관찰된 면역 패턴과 연관되어 있다. 취합해 보면, 이러한 결과는 IL-12-매개 면역조절이 헤피스 심플렉스 바이러스 질환에 대해 면역요법적 및/또는 예방적 간섭에 유효한 면역반응 프로필의 확립에 중요한 혜택을 제공함을 시사한다.

하기 실시예는 본 발명의 설명 목적으로 제공되며 본 발명의 범위를 제한하지는 않는다. 본원에서 인용되는 모든 참조문헌의 교시내용은 본원에서 참조로 인용된다.

실시예

재료 및 방법

허피스 심플렉스 바이러스 당단백질 D의 발현과 정제 및 백신 제조

허피스 심플렉스 바이러스 당단백질 D(gD) 백신의 제조방법은 Landolfi 등(Vaccine 11(4):407-414(1993))에 기재된 바와 같다.

실험 설계

암컷 Balb/C 마우스를 표 1에 개설된 그룹으로 무작위로 만든다($N = 10/\text{그룹}$). 0 및 21일째 되는 날에, 동물에 상기 gD 백신을 단독으로 또는 다양한 용량의 IL-12와 혼합하여 넓적다리에 근육내 투여한다. 마우스를 면역 전 및 면역 후 7일 간격으로 개별적으로 출혈시킨다. 각 그룹에서 5 마리의 마우스를 28일째 및 35일 째 되는 날에 참수시켜 면역 비장세포 및 질 세척물을 수거한다. 혈청 및 질 세척물의 분석은 효소-결합 면역분석(EIA)에 의한 gD 항원에 대한 IgA 및 IgG 서브클래스 항체 반응의 정량을 포함한다. 기능성 항체 활성을 혈청의 HSV 감염력 중화능에 의해 평가한다. 세포-매개 활성을 세포분해성 T 림프구 분석, 림프구 증식 분석 및 사이토kin 분비 패턴에 의해 평가한다.

EIA 분석

개별 혈청의 HSV gD-특이성 항체 반응을 York 등(Vaccine 13:1706-1712(1995))에 의해 기술된 바와 같이 EIA에 의해 정량한다.

간단히 말해서, 96-웰 플레이트를 정제된 gD로 1 시간 동안 20 ng/웰의 농도로 코팅한다. 플레이트를 0.01 M PBS 및 0.1% 트윈-20으로 3회 세척한 다음, PBS와 1% BSA의 용액을 사용하여 블로킹한다. 플레이트를 실온에서 1 시간 동안 배양한 다음, 0.01 M PBS 및 0.1% 트윈-20으로 3회 세척한다. 이어서, 0.05 M 트리스-완충 식염수내 혈청의 연속 2배 회석액을 2개 1조 웰에 가하고 1 시간 동안 배양한다. 웰을 2차 항체 첨가에 앞서 0.01 M PBS 및 0.1% 트윈-20으로 세척한다. 이들 항체는 호스래디시 페옥시다제(HRP)-표지 염소 안티-마우스 IgG(TBS 및 0.1% 트윈-20내 1:2000 희석), 바이오틴화 염소 안티-마우스 IgG1 및 IgG2a(TBS 및 0.1% 트윈-20내 400 ng/ml)로 구성된다. 애비딘-HRP를 50 ng/ml 농도로 IgG1 및 IgG2a 검출 웰에 가한다. 1 시간 배양 후에 웰을 ABTS(2,2'-아지노비스(3-에틸벤조티아졸린)-6-설폰산 디암모늄 염) 기질의 첨가에 앞서 세척한다. 생성되는 색채를 OD에 대해 405 nm에서 정량하고, 종점 외삽법에 의해 역가를 측정한다.

혈청 중화

개별 혈청을 전술한 바와 같이(Mishkin et al., Vaccine 9:147-153(1991)) 미세중화 분석법을 이용하여 HSV 중화역가를 평가한다.

간단히 설명해서, Vero 세포를 96-웰 평저 플레이트에서 유착시킨다. 시험 혈청을 30분간 56°C에서 열 분활성화시킨 다음 배지에 연속 2배 희석시켜 0.1 ml 부피를 얻는다. 이어서, 동등 부피의 HSV1 또는 HSV2(바이러스 대략 100 pfu 함유)를 가한다. 보체-의존 분석법의 경우, 10%(v/v) 기니 피그 보체도 포함시킨다. 이어서, 바이러스/혈청/(보체) 혼합물을 Vero 세포 단일층에 직접 첨가하기에 앞서, 부드럽게 흔들어 주면서 37°C(5% CO₂)에서 1 시간 동안 배양한다. 바이러스(즉, 무혈청 배지), 배지(즉, 비감염 세포), 및 보체(즉 무혈청 또는 무보체 배지) 대조군을 각각의 분석에 포함시킨다. 37°C에서 배양한 뒤에 세포를 1% 메틸셀룰로스로 오버레이시킨다. 바이러스 대조 웰에서 대략 50개의 플라크가 계수될 수 있을 때까지(즉, 48 내지 72 시간) 플레이트를 37°C(5% CO₂)에서 배양한다. 플라크를 계산하며, 역가는 50% 이상의 플라크 감소를 일으키는 최종 혈청 희석의 역수로 정의한다.

림프구 증식 반응

HSV-특이성 림프구 증식 분석법은 이미 상세히 기재되어 있다(Ishizaka et al., Viral Immunology 4:187-193(1991)). 비장세포를 마우스로부터 수거하여 보충된 RPMI(Roswell Park Memorial Institute medium N. 1640, 림프구 배양 시스템에 사용되는 일반 조직 배양 배지)에 모은다. 이어서, 세포를 0.1 ml 중의 96-웰 평저 플레이트에 2×10^5 생존 세포/웰

로 플레이팅한다. 5개의 똑같은 웰을 사용된 각각의 시험관내 자극 항체에 대해 포함시킨다. 이들은 배지, Vero 세포 용해물, HSV1(10^5 열 불활성화 pfu/웰), HSV2(10^5 열 불활성화 pfu/웰) 및 HSV2의 정제된 배클로바이러스-발현 재조합 당단백질 D(bgD2)(20 ng/웰)을 포함한다. 이들은 각각 0.1 ml 부피로 운반된다.

이어서, 플레이트를 37°C(5% CO₂)에서 5일간 배양한다. 수거하기 5 내지 6 시간 전에 각각의 웰을 RPMI 25 ml 중의 ³H-티미딘 0.5 μCi로 페用餐한다. 세포를 세포 수거기를 사용하여 유리 섬유 필터 매트 상에 수거하고, 베타플레이트 카운터를 사용하여 혼입된 활성을 측정한다.

세포독성 T 세포 활성

전술한 바와 같이(York et al., 1995) 비장세포를 특이적 CTL 활성의 2차 자극에 사용한다. 본 실험에서, 비장세포는 면역 14주 후 수거한다. 비장 세포 혼탁을 제조한 다음 실온에서 4분간 0.17% NH₄Cl(5 ml/비장)로 처리하여 적혈구를 삼투 제거한다. 이어서, 세포를 세척하고 계수하여 트립판 블루 다이 배척에 의해 생존성을 시험한다.

순수한(naive) 동물로부터의 비장세포를 항원 제공 세포(APC)로 사용한다. 이들을 γ선(2000R)에 노출시킨 다음 HSV1(스트레인 NS) 및 HSV2(스트레인 186)로 와동하에 37°C(5% CO₂)에서 1 시간 동안 감염 중복도(MOI) 5로 감염시킨다. 세포를 1회 세척하고, 5×10^6 세포/ml로 재현탁시킨 다음 다시 4 시간 동안 배양시킨다. 이어서 바이러스를 15분간 단파장 UV에 노출시켜 불활성화시킨다. 배지 5 ml 중의 2×10^7 작동세포/웰에 APC를 가한다(5×10^6 세포를 함유하는 1 ml). 이어서, 배양액을 세포분해 활성을 대한 ⁵¹Cr-방출 분석에 앞서 5일간 배양한다.

시험관내 재자극 후에 플레이트로부터 작동세포를 수거하고 트립판 블루 배척을 이용하여 생존성을 평가한다. 이어서, 세포 농도를 배지에서 조정하고 200 μl의 3개 한조 분취량에 플레이팅하여 목적하는 작동세포:표적(E:T)비를 수득한다. 이어서 희석액을 2배로 만든다.

A20 표적세포를 분석을 위해 적정수로 수거한다. 이들을 초기 1 시간 흡수기간 동안 10 MOI로 HSV1 및 HSV2로 감염시키고, 세척하여 추가로 3 시간 동안 배양한다. 대조군으로 사용될 비감염 A20 세포를 동일한 방법으로 모방-감염시킨다. 배양 3 시간 후, 5×10^6 내지 1×10^7 A20 표적물을 펠릿화하고 태 송아지 혈청 0.2 ml에 재현탁시키며, 여기에 ⁵¹Cr 200 μCi를 가하고, 1 시간 동안(37°C, 5% CO₂)에서 배양한다. 이어서, 세포를 RPMI 10 ml에서 2회 세척하고, 배지 1 ml에 재현탁시킨 다음, 희석시켜 적당한 E:T비의 100 ml 분취량을 수득한다.

작동세포 및 표지된 표적 세포를 4 시간 배양하고(37°C, 5% CO₂), 이 시기에 각각의 웰로부터 상등액 100 μl를 신중히 수집하여 감마 카운터상에서 감마 방출에 대해 평가한다. 2% 트윈-20으로 처리된 표지 표적의 3개 한조 웰을 사용하여 총 방출을 측정한다. 배지에서만 4 시간 배양한 표지된 표적 세포의 3개 한조 웰로부터 자연 방출을 계수한다. % 특이적 방출을 하기 공식을 이용하여 계산한다.

% 특이적 방출 =

$$\frac{(\text{CPM}_{\text{실험}}) - (\text{CPM}_{\text{자연}})}{(\text{CPM}_{\text{전체}}) - (\text{CPM}_{\text{자연}})} \times 100$$

사이토kin 분석

전술한 바와 같이(York et al., 1995), 효소-결합 면역스폿 분석(ELISPOT)을 IL-4 및 IFN-γ 분비 세포의 직접 계수에 사용한다. 멸균조건하에서, 밀리포어 HA 니트로셀룰로스 96-웰 밀리역가 플레이트를 멸균 PBS 중 5 μg/ml(안티-IFN-γ) 또는 2 μg/ml(안티-IL-4)의 농도로 안티-사이토kin MoAb 100 μl 부피로 코팅한다. 플레이트를 실온에서 밤새 배양한 다음 멸균수로 4회, 이어서 PBS와 0.05% 트윈-20으로 3회 세척한다. 이어서 웰을 RPMI 1640 및 1% BSA 0.2 ml를 사용하여 블로킹시킨 다음 5% CO₂(37°C)에서 10분간 배양한다. 이 시기 동안, 목적 농도의 세포 혼탁액을 제조한다.

각각 PBS로 및 0.05% 트윈-20을 함유하는 PBS로 3회 세척함으로써 블로킹 용액을 제거한다. 세포를 예정된 농도와 희석율로(즉, 1×10^6 /웰), 웰에 0.1 ml 부피로 삼중으로 접종한다. 플레이트를 5% CO₂(37°C) 배양기에서 20 시간 배양한다. 각각을 PBS로, 이어서 PBS와 0.05% 트윈-20으로 3회 세척하여 세포를 제거한다. 이어서 바이오틴화 MoAb를 PBS 및 0.05% 트윈-20 + 1% FBS에 최종농도 0.25 μg 안티-IFN-γ/ml 또는 4 μg 안티-IL-4/ml로 제조하고, 웰에 항체 용액 0.1 ml를 가한다. 플레이트를 습윤실내 4°C에서 밤새 배양한다.

PBS 및 0.05% 트윈-20 + 1% FBS에 1:400으로 희석한 페옥시다제-접합된 염소 안티-바이오틴 항체 0.1 ml/웰 첨가에 앞서 플레이트를 PBS 및 0.05% 트윈-20으로 3회 세척함으로써 스풋을 전개시킨다.

스폿을 가시화하기 위해, 기질 0.2 ml를 첨가하기에 앞서 플레이트를 PBS로 3회 세척한다. 이는 유리관내 디메틸포름아미드 1 ml에 3-아미노-9-에틸카바졸 10 mg을 용해시킨 다음 0.1 M 나트륨 아세테이트 완충액 30 ml를 첨가하여 제조한다. 사용 직전에, 15 μl H₂O₂를 기질 용액에 가한다. 스풋을 실온에서 5 내지 15분간 전개시키고, 템워터를 가하여 전개를 중단시킨다. 스풋을 해부 혈미경을 사용하여 계수한다.

결과

EIA 반응

안티-gD IgG 클래스 및 서브클래스 반응을 표 1에 요약하였다. 50 이하의 역가(최초 혈청 희석액)를 역가 25로 배정한다. 7일째 되는 날에, 생 HSV1으로 프라이밍된 마우스만이 의미있는 전체 IgG 역가를 보였다(표 1a). 그러나, 활성의 측정 가능한 수준이 가용성 gD 및 IL-12를 투여한 동물로부터의 혈청에 대해 기록되었다. 28일째까지는, 가용성 백신 단독으로 하였을 때와 비교하여 사이토킨의 모든 용량에서 가용성 서브유닛 백신과 IL-12를 투여한 마우스에서 증대된 반응 패턴이 나타났다. 여기에서, 반응은 가용성 gD를 1.0 μg IL-12와 투여한 마우스로부터의 혈청에서 최대였다. AlPO₄-흡착 당단백질을 투여한 마우스의 경우, AlPO₄와 gD + 0.2 μg IL-12로 면역시킨 동물에서만 증강된 IgG EIA 반응이 관찰되었으며, 대략 2배의 증가를 유도하였다. 35일째까지는, 가용성 gD(AlPO₄ 없음)에 대한 전체 IgG 항체 반응에 대해 용량 의존성 IL-12 보조효과가 나타났다. 0.2, 1.0 및 5.0 μg 의 IL-12와 gD를 동시투여하면 각각 5, 24 및 215배 증가된 반응을 유도하였다. 이와 대조적으로, IL-12를 AlPO₄-흡착 gD에 가하였을 때, 0.2 μg 의 IL-12로 최대 반응성이 일어났다.

저수준의 활성이 나타난 HSV1-감염 동물을 제외하고는 어떠한 처리 그룹에서도 7일째 되는 날에 IgG1 반응(표 1b)이 관찰되지 않았다. 50 이하의 역가(최초 혈청 희석액)를 역가 25로 배정한다. 28일째까지는, IL-12 없이 AlPO₄-흡착된 당단백질로 면역시킨 마우스로부터의 혈청에서 최대 IgG1 안티-gD 반응이 나타났다. 사실, AlPO₄ 흡착 백신에 IL-12의 첨가는 이 반응에서 명백한 용량-관련 감소를 유도하였다. 이와 대조적으로, 가용성 gD와 IL-12의 동시투여는 서브유닛만으로 하였을 때에 비해 증강된 IgG1 반응을 유도하였다. 그러나, IL-12가 없는 제형은 AlPO₄ 흡착 서브유닛 단독에 대해 관찰된 것만큼 큰 활성수준을 산출하였다. 35일째까지 IgG1 역가는 모든 그룹에서 쇠퇴하였다. 이 시기에, IL-12와 함께 가용성 gD를 투여한 마우스의 IgG1 역가는 AlPO₄-흡착 서브유닛 백신으로 면역시킨 후 보인 것들에 필적하는 수준에 이르렀다.

IgG2a 안티-gD 반응(표 1c)은 7일째까지 HSV1-프라이밍된 동물에서 명백하였다. 50 이하의 역가(최초 혈청 희석액)를 역가 25로 배정한다. 0.2 또는 5.0 μg IL-12와 투여한 가용성 gD로 한 이 시기에 적당한 반응이 주지된다. 28일째 되는 날에, IL-12 투여로 상당히 증가한 IgG2a 역자가 생성되었다. 이러한 점은 가용성 gD를 투여한 동물에서 특히 명백하였고, 여기에서 역가의 1000배 이상 증가가 관찰되었다. IL-12와 AlPO₄ 흡착 백신의 동시투여는 또한 gD-특이성 IgG2a 항체의 상당한 증가를 초래하였다. 이 경우에, IgG2a 항체 반응은 0.2 μg IL-12를 사용하였을 때 최대였으며, 이는 알루-결합된 IL-12가 생물학적 활성을 현저히 증강시켰음을 시사한다. 35일째 되는 날에, 전체 IgG에 대해 주목된 반응 패턴은 IgG2a 반응에 밀접하게 필적하였고 이는 IL-12와 서브유닛 gD 백신의 동시투여가 상당한 보조효과, 및 IgG2a 항체의 고역가 도출을 이끌어냈음을 나타낸다.

표 1a

HSV-2 gD 면역에 대한 혈장 IgG 항체 반응의 IL-12 증강

면역 양생법	혈장 IgG 암티-gD 역가					
	7일째		28일째		35일째	
	평균	S.E.	평균	S.E.	평균	S.E.
gD	25	0	29,159	10,420	9,063	2,993
gD + 0.2 µg IL-12	63	21	146,651	39,157	49,813	15,456
gD + 1.0 µg IL-12	34	7	210,267	67,806	217,061	88,404
gD + 5.0 µg IL-12	71	36	131,628	51,401	1,949,697	1,845,964
gD/AlPO ₄	25	0	95,979	23,312	62,578	34,793
gD/AlPO ₄ + 0.2 µg IL-12	25	0	212,949	44,935	179,917	116,925
gD/AlPO ₄ + 1.0 µg IL-12	25	0	82,313	52,122	69,958	47,544
gD/AlPO ₄ + 5.0 µg IL-12	25	0	32,182	29,807	28,673	24,310
AlPO ₄ + 5.0 µg IL-12	25	0	25	0	25	0
HSV1 (1×10^6 pfu)	783	515	1,824	514	4,446	1,807

표 1b

HSV-2 gD 면역에 대한 혈장 IgG1 항체 반응의 IL-12 증강

면역 양생법	혈장 IgG1안티-gD 역가					
	7일째		28일째		35일째	
	평균	S.E.	평균	S.E.	평균	S.E.
gD	25	0	14,323	4,939	4,421	1,019
gD + 0.2 µg IL-12	25	0	40,246	13,626	22,464	4,427
gD + 1.0 µg IL-12	25	0	59,536	25,196	21,592	5,511
gD + 5.0 µg IL-12	25	0	17,637	8,137	5,512	3,023
gD/AlPO ₄	25	0	82,882	57,045	17,232	5,177
gD/AlPO ₄ + 0.2 µg IL-12	25	0	28,247	4,147	10,421	4,726
gD/AlPO ₄ + 1.0 µg IL-12	25	0	1,604	734	5,426	3,588
gD/AlPO ₄ + 5.0 µg IL-12	25	0	1,345	1,206	3,957	24,310
AlPO ₄ + 5.0 µg IL-12	25	0	25	0	25	0
HSV1 (1x10 ⁵ pfu)	43	17	180	53	209	1,807

표 1c

HSV-2 gD 면역에 대한 혈장 IgG2a 항체 반응의 IL-12 증강

면역 양생법	혈장 IgG2a 안티-gD 역가					
	7일째		28일째		35일째	
	평균	S.E.	평균	S.E.	평균	S.E.
gD	25	0	25	0	152	127
gD + 0.2 µg IL-12	32	7	36,807	12,926	6,009	1,846
gD + 1.0 µg IL-12	25	0	49,034	18,983	33,547	11,290
gD + 5.0 µg IL-12	36	11	39,943	22,448	67,681	53,732
gD/AlPO ₄	25	0	522	330	30	5
gD/AlPO ₄ + 0.2 µg IL-12	25	0	48,321	19,366	47,153	40,467
gD/AlPO ₄ + 1.0 µg IL-12	25	0	22,400	12,011	7,715	3,418
gD/AlPO ₄ + 5.0 µg IL-12	25	0	5,801	5,288	2,669	1,195
AlPO ₄ + 5.0 µg IL-12	25	0	25	0	25	0
HSV1 (1x10 ⁵ pfu)	746	603	659	227	568	283

분비 항체 반응

질 분비물을 IL-12- 제형 gD로 면역시킨 후 항체 활성에 대해 분석한다. IgA 안티-gD(표 2a)가 다수의 처리 그룹에서 관찰된다. 최대 역가는 가용성 gD와 1.0 µg IL-12를 투여한 마우스로부터 유도된 분비물에서 일어난다. 이 그룹은 또한 28

일제 되는 날에 IgG 안티-gD(표 2b)의 최고 역가를 나타내었다. 비교적 확고한 IgG 역가가 AlPO₄-흡착 gD를 0.2 µg IL-12와 투여한 마우스에서 나타났다. 5 이하의 역가(최초 혈청 희석액)를 역가 3으로 배정한다. 35일제 되는 날에, 어떤 그룹의 질 세척물에서도 유의할 만한 gD-특이성 IgA가 존재하지 않았다. 그러나, 가용성 또는 AlPO₄-흡착 gD + 5.0 µg IL-12로 면역시킨 동물은 항원-특이성 IgG의 현저한 질 세척물 역가를 나타내었다.

표 2a

IL-12-제형된 gD에 대한 점막 IgA 안티-HSV-2 반응

면역 양생법	질 세척물 IgA 안티-gD 역가			
	28일제		35일제	
	평균	S.E.	평균	S.E.
gD	6.2	3.2	3.0	0
gD + 0.2 µg IL-12	9.4	4.0	3.0	0
gD + 1.0 µg IL-12	25.0	7.7	4.0	1.0
gD + 5.0 µg IL-12	3.0	0	4.0	1.0
gD/AlPO ₄	9.8	6.8	3.2	0.2
gD/AlPO ₄ + 0.2 µg IL-12	3.0	0	3.0	0
gD/AlPO ₄ + 1.0 µg IL-12	3.0	0	3.0	0
gD/AlPO ₄ + 5.0 µg IL-12	3.0	0	3.0	0
AlPO ₄ + 5.0 µg IL-12	6.2	3.2	3.0	0
HSV1 (1x10 ⁶ pfu)	4.6	1.6	3.0	0

표 2b

IL-12-제형된 gD에 대한 점막 IgG 안티-HSV-2 반응

면역 양생법	질 세척물 IgG 안티-gD 역가			
	28일제		35일제	
	평균	S.E.	평균	S.E.
gD	12.2	9.2	5.6	2.6
gD + 0.2 µg IL-12	7.4	3.0	5.0	0.9
gD + 1.0 µg IL-12	521.2	134.9	8.6	3.2
gD + 5.0 µg IL-12	15.0	12.0	61.6	28.5
gD/AlPO ₄	13.2	3.6	18.6	3.4
gD/AlPO ₄ + 0.2 µg IL-12	165.41	143.1	3.0	0
gD/AlPO ₄ + 1.0 µg IL-12	12.2	9.2	3.0	0
gD/AlPO ₄ + 5.0 µg IL-12	50.8	6.2	123.4	59.0
AlPO ₄ + 5.0 µg IL-12	3.0	0	3.0	0
HSV1 (1x10 ⁶ pfu)	3.0	0	3.0	0

혈청 HSV-2 중화 역가

보체 증강된 중화 항체 역가(표 3)는 가용성 gD를 IL-12와 투여한 마우스로부터의 혈청에서 용량-의존식으로 증가하였다. 이들 역가는 0.2, 1.0 및 5.0 µg의 사이토kin 수준에서 각각 5, 15 및 50배까지 증가하였다. 10 이하의 역가(최초 혈청 희석액)를 역가 5로 배정하였다. ELISA로 측정한 안티-gD 반응의 경우에서와 같이, 알륨-흡착 gD에 의해 유도된 최대 바이러스 중화 반응은 0.2 µg IL-12로 유도되었다.

표 3

gD 면역에 대한 혈장 중화 항체 반응의 IL-12 증강

면역 양생법	혈장 HSV- 2 중화 여가	
	평균	S.E.
gD	22.5	11.1
gD + 0.2 μg IL-12	111.2	29.0
gD + 1.0 μg IL-12	353.4	116.2
gD + 5.0 μg IL-12	1,125.8	852.4
AlPO ₄	81.0	40.9
gD/AlPO ₄ + 0.2 μg IL-12	294.8	213.7
gD/AlPO ₄ + 1.0 μg IL-12	17.9	7.0
gD/AlPO ₄ + 5.0 μg IL-12	8.5	2.2
AlPO ₄ + 5.0 μg IL-12	5.0	0
HSV1 (1x10 ⁵ pfu)	100.8	52.2

림프구 증식 반응

리콜 항원에 대한 시험관내 배자발생 반응을 표 4에 요약하였다. 리콜 항원은 숙주가 이전에 대하였던 항원이다; 여기에서, 면역된 마우스에 대한 리콜 항원은 gD이다. HSV-1 및 HSV-2에 관한 용어의 사용은 바이러스-발현된 gD와의 고도의 교차 반응성을 가정한다. 어떤 그룹도 Vero 세포 대조군 항원에 대해 높은 수준의 비-특이성 활성을 입증하는 것으로 판찰되지 않았다. HSV-1 항원에 대한 이종 반응은 가용성이고 AlPO₄ 흡착된 gD와 1.0 μg IL-12로 면역시킨 마우스로부터 수거된 세포에서 최대였다. 유사한 반응 패턴이 HSV2 및 gD2 항원으로 행한 시험관내 시뮬레이션에 대해 기록되었다. 흥미롭게도, HSV-1으로 프라이밍된 마우스로부터의 비장 세포가 본 실험에서 HSV-2 gD에 대해 반응성을 입증하였다.

표 4

gD/TL-12 림프구 증식 반응

면역 양생법	시험관내 자극에 대한 자극 지수			
	Vero	HSV1	HSV2	gD2
gD	0.73	0.32	1.79	2.39
gD + 0.2 μg IL-12	1.77	1.31	11.54	6.14
gD + 1.0 μg IL-12	0.51	29.18	17.42	2.59
gD + 5.0 μg IL-12	0.60	3.78	7.97	1.58
gD/AlPO ₄	1.08	0.67	4.19	5.87
gD/AlPO ₄ + 0.2 μg IL-12	1.13	4.44	3.14	1.67
gD/AlPO ₄ + 1.0 μg IL-12	0.68	16.54	33.87	17.79
gD/AlPO ₄ + 5.0 μg IL-12	1.25	4.2	4.42	1.71
AlPO ₄ + 5.0 μg IL-12	0.91	1.64	1.96	2.28
HSV1 (1x10 ⁵ pfu)	0.94	2.71	9.15	1.36

사이토킨 반응

1.0 μg 용량의 IL-12를 사용하여 마우스의 선발 그룹에 대해 사이토킨 프로필을 평가하여 표 5에 요약하였다. 단독으로 투여한 가용성 또는 AlPO₄ 흡착된 gD 투여에 비해, IL-12를 첨가한 경우 IL-4에 대해 IFN-γ의 분비가 상당히 증가하였다.

표 5

사이토킨 프로필

면역 양생법	SFC/10 ⁵ 배양 세포		
	IL-4	IFN-γ	IFN-γ/IL-4
5 μg gD	35	45	1.28
5 μg gD + 1 μg IL-12	85	215	2.53
5 μg gD/AlPO ₄	40	35	0.88
5 μg gD/AlPO ₄ + 1 μg IL-12	60	185	3.08
AlPO ₄ + 1 μg IL-12	50	85	1.70
HSV1	495	545	1.10
순수	30	65	1.65

세포분해 활성

gD + 1.0 μg IL-12, 또는 대조군 백신으로 면역시킨 동물에 대한 CTL 반응을 표 6에 요약하였다. HSV-1-프라이밍된 마우스는 25:1 내지 3:1 범위의 E:T 비에서 비교적 균일한 세포분해 활성을 산출하였다. 가용성 gD + 1.0 μg IL-12로 면역시킨 마우스로부터 유도된 면역세포 배양액에서 필적할 만한 수준의 사멸이 관찰되었다. 여타 백신 또는 대조군으로부터의 비장 세포에서는 어떠한 유의할 만한 세포분해 활성도 관찰되지 않았다.

표 6

CTL 활성

면역	E:T 비에서의 순 세포분해			
	25:1	12:1	6:1	3:1
gD	4.9	-1.0	7.2	9.3
gD + 1.0 μg IL-12	29.3	7.6	23.6	18.1
gD/AlPO ₄	10.1	7.6	9.7	3.1
gD/AlPO ₄ + 1.0 μg IL-12	7.1	5.6	6.5	5.5
AlPO ₄ + 1.0 μg IL-12	15.1	-3.4	2.4	-4.7
HSV1	24.6	36.9	32.1	26.1
순수	-0.3	3.7	-	4.0

균등물

당업자는 단지 일상적인 실험을 이용하여 본원에 기술된 본 발명의 특정 양태에 대한 다수의 균등물을 인식하게 되거나 확인할 수 있다. 이러한 균등물 역시 본 발명의 범위내에 포함된다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

삭제

청구항 2.

삭제

청구항 3.

삭제

청구항 4.

삭제

청구항 5.

삭제

청구항 6.

삭제

청구항 7.

삭제

청구항 8.

삭제

청구항 9.

삭제

청구항 10.

삭제

청구항 11.

삭제

청구항 12.

삭제

청구항 13.

삭제

청구항 14.

삭제

청구항 15.

삭제

청구항 16.

삭제

청구항 17.

삭제

청구항 18.

삭제

청구항 19.

삭제

청구항 20.

삭제

청구항 21.

삭제

청구항 22.

허피스 심플렉스 I 형의 당단백질 D, 허피스 심플렉스 II 형의 당단백질 D 및 이들의 조합으로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 허피스 심플렉스 바이러스 항원, 보조량의 인터루킨-12, 및 혼탁 알룸의 혼합물을 포함하고, 임의로 생리학적으로 허용되는 비히클을 포함하는 백신 조성물.

청구항 23.

제 22 항에 있어서, 인터루킨-12가 상기 혼탁 알룸에 흡착되는 백신 조성물.

청구항 24.

제 22 항에 있어서, 인터루킨-12가 인간 인터루킨-12인 백신 조성물.

청구항 25.

제 22 항에 있어서, 알룸이 수산화 알루미늄 또는 인산 알루미늄인 백신 조성물.

청구항 26.

삭제

청구항 27.

삭제

청구항 28.

삭제

청구항 29.

삭제

청구항 30.

삭제

청구항 31.

삭제

청구항 32.

허피스 심플렉스 I 형의 당단백질 D, 허피스 심플렉스 II 형의 당단백질 D 및 이들의 조합으로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 허피스 심플렉스 바이러스 항원, 보조량의 인터루킨-12 및 혼탁 알룸의 혼합물을 포함하고, 임의로 생리학적으로 허용되는 비히클을 포함하는 면역원 조성물.

청구항 33.

제 32 항에 있어서, 인터루킨-12가 상기 혼탁 알룸에 흡착되는 면역원 조성물.

청구항 34.

제 32 항에 있어서, 인터루킨-12가 인간 인터루킨-12인 면역원 조성물.

청구항 35.

제 32 항에 있어서, 알룸이 수산화 알루미늄 또는 인산 알루미늄인 면역원 조성물.

청구항 36.

삭제